

УДК 577.2

Храмов Алексей Парамонович
доцент, к.б.н. ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И.
Скрябина

Уграицкая Василиса Маратовна
Студентка 2 курса магистратуры
“Зоотехния”

ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И.
Скрябина

РАССМОТРЕНИЕ НА ПРИМЕРЕ ЛИНКЕРА ASIC КАНАЛОВ СПОСОБ СОЗДАНИЯ ХИМЕРНОГО ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ ВЕКТОРА pVAX1.

Аннотация: В этой статье приведены характеристики и общие сведения о структуре вектора pVAX1 и линкере ASIC каналов. Также здесь рассматривается способ его модификации для дальнейших исследований в лабораторных условиях.

Ключевые слова: вектор, pVAX1, линкер, ASIC-каналы, праймеры, плазмида, клонирование.

Authors:

Hramov Alexey Paramonovich
Russia, Moscow Associate
Professor, Candidate of Biological Sciences,
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
Moscow state Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA
by K.I. Skryabin
Vasilisa Maratovna Ugraitskaya

2nd year student of the Master's degree in "Animal Science"
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
Moscow state Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA
by K.I. Skryabin

Abstract: This article presents the characteristics and general information about the structure of the pVax1 vector and the ASIC channel linker. The method of its modification for further research in laboratory conditions is also considered here.

Keywords: vector, pVax1, linker, ASIC channels, primers, plasmid, cloning.

Линкеры ASIC каналов и подбор сайтов рестрикции для клонирования

Последовательность аминокислотных линкеров, связывающих субъединицы, была выбрана, исходя из литературных данных, структуры генов каналов и возможности клонирования в вектор pVAX.

Ранее для контатамерных каналов ASIC1a/ ASIC2a [13] было показано, что использование линкера Asn-Asn-Asn-Asp-Ile-Asn-Asn (NNNDINN) для сшивки субъединиц позволило получить функциональные контатамерные каналы.

Подобная структура линкера была выбрана за основу.

Дополнительно линкер должен быть содержать сайты рестрикции, отсутствующие в целевых генах rASIC3 и hASIC3. Также подходящие сайты рестрикции должны содержаться в векторе для клонирования.

Анализ структуры генов позволил подобрать следующие линкеры (табл.1).

Таблица 1. Состав линкеров

	Кодируемая аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
Линкер 1	NNVDINN	Aataatgtcgacatcaataat Sall
Линкер 2	NNQALNN	Aataatcaagctttaataat HindIII

Дополнительно для создания химерных конструкций были выбраны рестриктазы **BglII** и **EcoR1**, также отсутствующие в целевых генах.

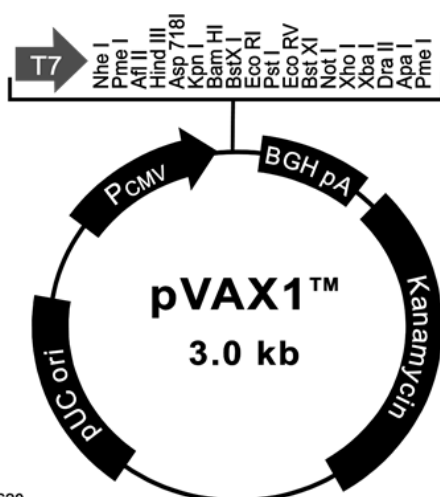
Подготовка вектора для клонирования

Вектор pVAX1

pVAX1™ представляет собой плазмидный вектор размером 3,0 т.п.н., который часто используется для клонирования генов, предназначенных для экспрессии в клетках млекопитающих.

Особенности вектора позволяют реплицировать большое количество копий в *E.coli* и быстро экспрессировать интересующий белок в большинстве клеток млекопитающих. Вектор содержит следующие элементы (рис.1):

- Промотор раннего цитомегаловируса человека для высокого уровня экспрессии в широком спектре клеток млекопитающих.
- Сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH) для эффективного завершения транскрипции и полиаденилирования мРНК.
- Ген устойчивости к канамицину для селекции в кишечной палочке.



Comments for pVAX1™:
2999 bp

CMV promoter: bases 33-620
T7 promoter/priming site: bases 664-683
Multiple cloning site: bases 696-811
BGH reverse priming site: bases 823-840
BGH polyadenylation signal: bases 829-1053
Kanamycin resistance gene: bases 1226-2020
pUC origin: bases 2320-2993

Рисунок 1. Схема строения pVAX1 вектора.

Пример изменения его для работы.

В pVAX1 векторе имеются участки лишь для некоторых выбранных рестриктаз. Методом направленного мутагенеза полилинкер вектора был изменен и добавлены сайты рестрикции для рестриктаз BglII и Sall, что обеспечивало последовательное клонирование отдельных субъединиц (табл. 2).

Таблица 2. Сравнение изначальной структуры pVAX1 вектора и изменённого для дальнейших работ вектора pVAX1-new

Вектор	pVax1	pVax1-new
Последовательность сайтов рестрикции в полилинкере	NheI-Hind3-EcoRI	NheI-BglII-Sall-Hind3-EcoRI
Нуклеотидная последовательность полилинкера	GACCCAAGCTGGCTAGCGTTT AAACTTAAGCTTGGTACCGAG CTCGGATCCACTAGTCCAG.....GAATTC	GACCCAAGCTGGCTAGCGTTAGATCT CGAGGTCGACACTTAAGCTTGGTACC GAGCTCGGATCCACTAGTCCAG.....GAATTC

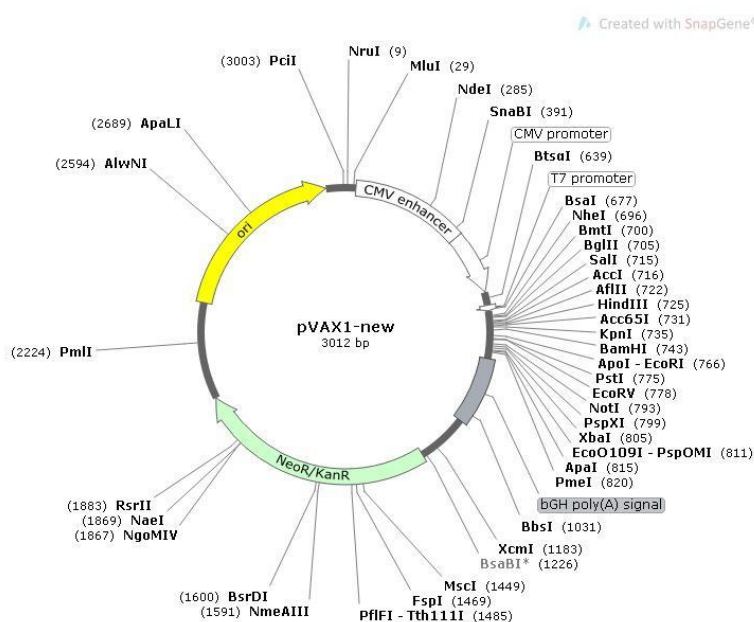


Рисунок 2. Модифицированный для работы pVAX1 вектор после вставки в него двух сайтов рестрикции BglII SalI

Для решения поставленной задачи нужно было получить фрагменты ДНК, содержащие соответствующие фланкирующие 5' и 3' нуклеотидные последовательности с сайтами рестрикции. Все фрагменты, предназначенные для последующего клонирования в вектор pVAX, не должны были иметь ошибок в последовательности, кодирующей белки канала, т.к. секвенирование целевых конструкций было невозможно из-за повторяющихся ДНК фрагментов.

Фрагменты ДНК были амплифицированы методом ПЦР с исходной матрицы (соответственно, плазмиды pcDNA3.1(rASIC3) и pcDNA3.1(hASIC3) с использованием специфичных праймеров (структура праймеров в таблицах 3 и 4). Праймеры использовались попарно для получения соответствующего фрагмента – см. Таблица 4. Все амплифицированные фрагменты были заклонированы в pAL-TA вектор (Евроген), предназначенный для быстрого клонирования продуктов ПЦР, и отсекуированы в обоих направлениях. Далее использовались только клоны, содержащие верифицированные фрагменты, при трансляции которых в аминокислотной последовательности белков rASIC3 и hASIC3 не содержалось ошибок.

Таблица 3. Структура праймеров, использованных для амплификации ДНК фрагментов hASIC3

Название праймера	Структура праймера
hA3-Bgl2-HA	5'ctccttagatctatgaagccacctcaggcc 3' 31 bp
hA3-Sal1-HArev	5' gatgtcgacattattgagctgtgtgacaaggtagcag 3' 37 bp
hA3-Sal1-HB	5' aatgtcgacatcaataatatgaagccacctcaggcc 3' 37 bp
hA3-Hind3-HBrev	5'ttaaagcttgattattgagctgtgtgacaaggtagcag 3' 38 bp
hA3-Hind3-HC	5'atcaagctttaataatatgaagccacctcaggcc 3' 36 bp
hA3-EcoR1-HCrev	5'attggattcctagagctgtgtgacaaggtagcag 3' 34 bp

Таблица 4. Структура праймеров, использованных для амплификации ДНК фрагментов rASIC3

Название праймера	Структура праймера
rA3-Bgl2-RA	5'ctccttagatctatgaaacctcgctccggactg 3' 33 bp
rA3-Sal1-RArev	5'gatgtcgacattattgagccttgtagcaggtaacag 3' 37 bp
rA3-Sal1-RB	5' aatgtcgacatcaataatatgaaacctcgctccggactg 3' 39 bp
rA3-Hind3-RBrev	5'ttaaagcttgattattgagccttgtagcaggtaacag 3' 38 bp
rA3-Hind3-RC	5'atcaagctttaataatAtgaaacctcgctccggactg 3' 38 bp

Таблица 5. Попарное использование праймеров для амплификации.

Фрагмент ДНК	Прямой праймер	Обратный праймер
H1	hA3-Bgl2-HA	hA3-Sal1-HArev
H2	hA3-Sal1-HB	hA3-Hind3-HBrev
H3	hA3-Hind3-HC	hA3-EcoR1-HCrev
R1	rA3-Bgl2-RA	rA3-Sal1-RArev
R2	rA3-Sal1-RB	rA3-Hind3-RBrev
R3	rA3-Hind3-RC	rA3-EcoR1-RCrev

Таким образом, в распоряжении были клоны, содержащие в составе вектора pAL-TA последовательности:

R1 **BglII** – rASIC3 — linker1- **SalI** (клон pAL-TA (R1))

R2 **SalI** - rASIC3 - linker2- **Hind3** (клон pAL-TA (R2))

R3 **Hind3**- rASIC3-stop-**EcoR1**(клон pAL-TA (R3))

H1 **BglII** – hASIC3—linker1- **SalI**(клон pAL-TA (H1))

H2 **SalI**- hASIC3- linker2- **Hind3**(клон pAL-TA (H2))

H3 **Hind3**- hASIC3-stop-**EcoR1**(клон pAL-TA (H3))

Дальнейшая стратегия заключается в последовательном клонировании фрагментов в вектор pVAX1-new.

ИСТОЧНИКИ:

1. Adelman, J.P., McCleskey, E.W. (2007) A conformation change in the extracellular domain that accompanies desensitization of acid-sensing ion channel (ASIC) 3, *J. Gen. Physiol.*, **129**, 345–350.
2. Allen, N.J., Attwell, D. (2002) Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals, *J. Physiol.*, **543**, 521–529.
3. Alvarez de la Rosa D., Krueger S.R., Kolar A., Shao D., Fitzsimonds R.M., Canessa C.M. Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system / *J. Physiol.* 2003. V. 546. № 1. P. 77 – 87
4. Baconguis I., Bohlen C.J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel / *Cell*. 2014. V. 156. № 4. P. 717 – 729
5. Baconguis I., Gouaux E. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes / *Nature*. 2012. V. 489. № 7416. P. 400 – 405
6. Bargeton, B., Kellenberger, S. (2010) The contact region between three domains of the extracellular loop of ASIC1a is critical for channel function, *J. Biol. Chem.*, **285**, 13816– 13826.
7. Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., Lingueglia, E. (2008) Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons, *J. Neurosci.*, **28**, 1498–1508.
8. Bartoi T., Augustinowski K., Polleichtner G., Gründer S., Ulbrich M.H. Acid-sensing ion channel (ASIC) 1a/2a heteromers have a flexible 2:1/1:2 stoichiometry / *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. V. 111. № 22. P. 8281 – 8286
9. Benos, D.J., Stanton, B.A. (1999) Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ ENaC) superfamily of ion channels, *J. Physiol.*, **520**, 631–644.
10. Benson, C.J., Xie, J., Wemmie, J.A., Price, M.P., Henss, J.M., Welsh, M.J., Snyder, P.M. (2002) Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2338–2343.
11. Coric, T., Zhang, P., Todorovic, N., Canessa, C.M. (2003) The extracellular domain determines the kinetics of desensitization in acid-sensitive ion channel 1, *J. Biol. Chem.*, **278**, 45240–45247.
12. Coric, T., Zheng, D., Gerstein, M., Canessa, C.M. (2005) Proton sensitivity of ASIC1 appeared with the rise of fishes by changes of residues in the region that follows TM1 in the ectodomain of the channel, *J. Physiol.*, **568**, 725–735.
13. Coryell M.W., Ziemann A.E., Westmoreland P.J., Haenfler J.M., Kurjakovic Z., Zha X. ming, Price M., Schnizler M.K., Wemmie J.A. Targeting ASIC1a Reduces Innate Fear and Alters Neuronal Activity in the Fear Circuit / *Biol. Psychiatry*. 2007. V. 62. № 10. P. 1140 – 1148
14. Coryell, M.W., Wunsch, A.M., Haenfler, J.M., Allen, J.E., McBride, J.L., Davidson, B.L., Wemmie, J.A. (2008) Restoring Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala of knockout mice rescues fear memory but not unconditioned fear responses, *J. Neurosci.*, **28**, 13738–13741.
15. Coscoy, S., de Weille, J.R., Lingueglia, E., Lazdunski, M. (1999) The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore, *J. Biol. Chem.*, **274**, 10129–10132.
16. Cushman, K.A., Marsh-Haffner, J., Adelman, J.P., McCleskey, E.W. (2007) A conformation change in the extracellular domain that accompanies desensitization of acid-sensing ion channel (ASIC) 3, *J. Gen. Physiol.*, **129**, 345–350.